

#62

## PROCESS TO ELIMINATE HAEMOGLOBIN ERRORS DURING THE DETERMINATION OF ALBUMIN

Patent Number: WO9745728  
 Publication date: 1997-12-04  
 Inventor(s): WEISHEIT RALPH (DE); MASTERS BARBARA (US)  
 Applicant(s):: WEISHEIT RALPH (DE); BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE); MASTERS BARBARA (US)  
 Requested Patent: ☐ WO9745728  
 Application Number: WO1997EP02862 19970602  
 Priority Number (s): DE19961022091 19960531; US19970047997P 19970528  
 IPC Classification: G01N33/487 ; G01N33/68  
 EC Classification: G01N33/487, G01N33/68A6  
 Equivalents: AU3171797, CN1214770, CZ9800271, ☐ EP0906567 (WO9745728), B1, HU9900723, JP2000512381T, PL330221

### Abstract

The invention relates to a process for determination of albumin in a sample containing free haemoglobin by optical measurement at at least two wave lengths. According to said process, (a) a measuring signal which is sufficiently high for determination is provided at a first measuring wave length; (b) (i) no measuring signal for albumin or (ii) a measuring signal for the albumin is provided at a second measuring wave length, said signal being smaller in comparison with the measuring signal at the first measuring wave length; and (c) at the first and the second measuring wave length a comparatively high interfering signal which is produced by reaction of haemoglobin with the test reagent used to determine albumin, and which changes in relation to time.

Data supplied from the esp@cenet database - I2



**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :

G01N 33/487, 33/68

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 97/45728**

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

4. Dezember 1997 (04.12.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/02862

(22) Internationales Anmeldedatum: 2. Juni 1997 (02.06.97)

(30) Prioritätsdaten:

196 22 091.2

31. Mai 1996 (31.05.96)

DE

60/047,997

28. Mai 1997 (28.05.97)

US

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):  
BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer  
Strasse 112-132, D-68305 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEISHEIT, Ralph [DE/DE];  
Adlerweg 2a, D-82362 Weilheim (DE). MASTERS, Barbara  
[US/US]; Boehringer Mannheim Corporation, Evaluation  
Dept., 9115 Hague Road, P.O. Box 50457, Indianapolis, IN  
46250-0457 (US).(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-  
81679 München (DE).(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, CZ, HU, IL, JP, KR, MX,  
NZ, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

*Mit internationalem Recherchenbericht.**Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen  
Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen  
eintreffen.*

(54) Title: PROCESS TO ELIMINATE HAEMOGLOBIN ERRORS DURING THE DETERMINATION OF ALBUMIN

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESEITIGUNG VON HÄMOGLOBIN-STÖRUNGEN BEI DER BESTIMMUNG VON ALBU-  
MIN

(57) Abstract

The invention relates to a process for determination of albumin in a sample containing free haemoglobin by optical measurement at at least two wave lengths. According to said process, (a) a measuring signal which is sufficiently high for determination is provided at a first measuring wave length; (b) (i) no measuring signal for albumin or (ii) a measuring signal for the albumin is provided at a second measuring wave length, said signal being smaller in comparison with the measuring signal at the first measuring wave length; and (c) at the first and the second measuring wave length a comparatively high interfering signal which is produced by reaction of haemoglobin with the test reagent used to determine albumin, and which changes in relation to time.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Bestimmung von Albumin in einer freies Hämoglobin enthaltenden Probe durch optische Messung bei mindestens zwei Wellenlängen, wobei (a) bei einer ersten Meßwellenlänge ein zur Bestimmung ausreichend hohes Meßsignal für Albumin vorliegt; (b) bei einer zweiten Meßwellenlänge (i) kein Meßsignal für Albumin oder (ii) ein im Vergleich zum Meßsignal bei der ersten Meßwellenlänge geringeres Meßsignal für Albumin vorliegt; und (c) bei der ersten und bei der zweiten Meßwellenlänge ein vergleichbar hohes Störsignal vorliegt, das durch eine Reaktion von Hämoglobin mit dem zur Bestimmung von Albumin verwendeten Testreagenz erzeugt wird und sich zeitabhängig ändert.

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

## Verfahren zur Beseitigung von Hämoglobin-Störungen bei der Bestimmung von Albumin

5

### Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Albumin in einer freies Hämoglobin enthaltenden Probe durch optische Messung.

10

Bekanntermaßen wird die nichtimmunologische Bestimmung von Albumin in Serum und Plasma (z.B. mittels Bromcresolgrün-Methode) durch Hämoglobin (Hb) und Hämoglobin-analoge Verbindungen derart gestört, daß bei Anwesenheit dieser Störsubstanzen falsch erhöhte Albuminwerte erhalten werden. Die Ursache hierfür liegt in einer Reaktion von Hämoglobin mit dem Farbstoff, wodurch Hb quantitativ als Albumin erfaßt wird (Doumas et al, Clin. Chim. Acta 31, 87-96 (1971)).

Im Patent EP 0 268 025 B1 wird darauf verwiesen, daß die Hb-Störung des Albumin-Tests nicht durch eine konventionelle 2-Punkt-Messung beseitigt werden kann. Es wird jedoch vorgeschlagen, aus dem Zusammenhang zwischen Hämolysegrad und Meßfehler einen Korrekturfaktor zu ermitteln und mit dessen Hilfe (im Anschluß an eine separate Bestimmung des Hämolysegrades) das für eine bestimmte Probe erhaltene fehlerhafte Albuminergebnis rechnerisch zu korrigieren.

Jay und Provasek (Clin. Chem. 39/9, 1804-1810 (1993)) beschrieben, daß in ihrem Labor bei jeder erkennbar hämolytischen Probe der Hb-Gehalt dieser Probe separat bestimmt und über ein Computerprogramm das (verfälschte) Ergebnis der Analytbestimmung rechnerisch korrigiert wird. Die Höhe dieser Korrektur wird anschließend auf dem Analysenbefund angegeben.

35

Eine weitere Möglichkeit zur Korrektur der Hb-Störung für Albumin beschreibt die Offenlegungsschrift DE 4427492 A1. Hier

entfällt eine separate Bestimmung des Hämolysegrades, da dieser aus einer der eigentlichen Hauptreaktion vorgeschalteten Vorreaktion abgeleitet werden kann. Nach dem sogenannten Rate<sub>plus</sub>-Verfahren wird das in der Hauptreaktion erhaltene Meß-  
5 ergebnis unter Ausnutzung eines gefundenen Zusammenhanges zwischen Hämolysegrad und Störbeitrag rechnerisch korrigiert.

In den bisher beschriebenen Methoden zur Beseitigung der Hb-Störung bei Albumin-Bestimmungen ist generell eine rechnerische Korrektur des Analysenergebnisses um einen dem Hb-Gehalt entsprechenden Betrag erforderlich. Dabei wird der Hb-Gehalt bzw. Hämolysegrad entweder durch separate Messung (z.B. durch Multiwellenlängenanalyse oder eine unabhängige Methode) ermittelt oder durch eine Vorreaktion abgeleitet, wobei immer  
15 ein 2-Reagenzien-Test erforderlich ist.

Die Bestimmung von Albumin erfolgt derzeit jedoch häufig als 1-Punkt-Messung mittels eines Monoreagenzes, wobei die Farb-reaktion durch Vermischen von Probe und Reagenz gestartet wird  
20 (z.B. Albumin-Reagenz der Fa. Boehringer Mannheim GmbH). Der Vorteil einer solchen Bestimmung ist neben der einfachen Handhabung auch ein niedriger Preis. Aufwendig ist jedoch die Beseitigung der Hb-Störung: Entweder Monoreagenz und separate Ermittlung des Hb-Gehaltes oder ein 2-Reagenzien-Test und  
25 Vermeidung einer separaten Ermittlung des Hb-Gehaltes. In jedem Fall muß das erhaltene Analysenergebnis anschließend rechnerisch korrigiert werden.

Darüber hinaus wird bei der Bestimmung von Hämoglobin enthaltenden Serum- oder Plasmaproben die Hauptreaktion (Albumin mit dem Testreagenz) durch eine Störreaktion (Hämoglobin mit dem Testreagenz) und einer im Zusammenhang mit der Störreaktion verbundenen Abnahme des Absorptionssignals von Hämoglobin selbst überlagert. Zusätzlich unterscheiden sich die Absorp-  
30 tionsspektren sowohl der Hauptreaktion als auch der Störreaktion in der Abhängigkeit von den jeweils verwendeten Albumintestreakenzen.

Überraschend wurde gefunden, daß der Einfluß der Störreaktion auf das Ergebnis der Hauptreaktion abhängig ist von der Kombination der verwendeten Meßwellenlängen und darüber hinaus auch von der Reaktionszeit.

5

Die Beseitigung der Hämoglobinstörung bei der Bestimmung von Albumin ist damit sehr komplex, da es sich hierbei nicht um ein Störsignal im üblichen Sinn handelt, das über eine einfache bichromatische Messung bzw. über eine einfache Messung  
10 des Probenleerwerts beseitigt werden kann. Vielmehr reagiert die Störsubstanz, d. h. natives, vernetztes, polymerisiertes oder rekombinant hergestelltes Hämoglobin, selbst direkt mit dem Reagenz. Es muß daher nach Meßwellenkombinationen gesucht werden, bei denen diese Störreaktion eindeutig von der eigent-  
15 lichen Hauptreaktion unterscheidbar ist.

Gelöst wurde diese Aufgabe durch Veränderung der Kombination von Meßwellenlängen, d. h. Haupt- und der Nebenmeßwellenlänge, bei einer bichromatischen Messung. Überraschenderweise wurde  
20 gefunden, daß bei veränderten Kombinationen von Wellenlängen sich ein durch freies Hämoglobin in der Probe hervorgerufener Meßfehler weitgehend unterdrücken läßt (siehe Abb. 1, 3, 4, 5, 7, 8, 10 und 11). Bei diesen Wellenlängenkombinationen, die im allgemeinen nicht im Absorptionsmaximum der Testreagenzien  
25 liegen, ändert sich das Meßsignal einer hämoglobinhaltigen Probe zeitabhängig, während das Meßsignal einer hämoglobinfreien Probe im wesentlichen konstant bleibt.

Dieser Effekt wird jedoch nicht beobachtet bei der üblicherweise zur Bestimmung von Albumin verwendeten Wellenlängenkom-  
30 bination, d.h. einer Hauptwellenlänge von 600 nm und einer Nebenwellenlänge von 700 nm. Hier findet man einen hohen Meßfehler bei einer Hämoglobin-haltigen Probe gegenüber einer Hämoglobin-freien Probe (vgl. Abb. 2, 6 und 9).

35

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Bestimmung von Albumin in einer freies Hämoglobin

enthaltenden Probe durch optische Messung bei mindestens zwei Wellenlängen, dadurch gekennzeichnet, daß

- 5 (a) bei einer ersten Meßwellenlänge ein zur Bestimmung ausreichend hohes Meßsignal für Albumin vorliegt,
- (b) bei einer zweiten Meßwellenlänge (i) kein Meßsignal für Albumin oder (ii) eine im Vergleich zum Meßsignal bei der ersten Meßwellenlänge geringeres Meßsignal für Albumin  
10 vorliegt und
- (c) bei der ersten und bei der zweiten Meßwellenlänge ein vergleichbar hohes Störsignal vorliegt, das durch eine Reaktion von Hämoglobin mit dem zur Bestimmung von Albumin  
15 verwendeten Testreagenz erzeugt wird und das sich zeitabhängig ändert.

Für das erfindungsgemäße Verfahren wird eine Meßwellenlängen-  
kombination verwendet, wobei bei einer ersten Meßwellenlänge  
20 ein zur Bestimmung ausreichend hohes Meßsignal für Albumin vorliegt. Dabei ist anzumerken, daß die erste Meßwellenlänge nicht mit Absorptionsmaximum der verwendeten Testreagenzien liegen muß, sondern vorzugsweise sogar außerhalb des Absorptionsmaximums liegt. Bei der zweiten Meßwellenlänge liegt ein  
25 Meßsignal für Albumin vor, das deutlich geringer als das Signal bei der ersten Meßwellenlänge ist. Vorzugsweise ist das Meßsignal bei der ersten Meßwellenlänge mindestens 20 mE und besonders bevorzugt mindestens 50 mE höher als bei der zweiten Meßwellenlänge.

30 Weiterhin soll bei der ersten und bei der zweiten Meßwellenlänge ein vergleichbar hohes Störsignal vorliegen, welches sich zeitabhängig ändert. Vorzugsweise wird daher bei einer Einpunktmessung der Meßpunkt so gewählt, daß das durch die  
35 Reaktion von Hämoglobin mit dem Testreagenz verursachte Störsignal bei der ersten und bei der zweiten Meßwellenlänge gleich oder annähernd gleich groß ist.



Bei einer Mehrpunktmessung, z.B. einer Zweipunktmessung (2-Reagenzientest mit Messung des Probenleerwerts und des Analytwerts) werden die Meßpunkte vorzugsweise so gewählt, daß unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors aus den Pipettiervolumina der Einzelreagenzien das Störsignal bei den Meßzeitpunkten, z.B. beim ersten und beim zweiten Meßzeitpunkt, gleich oder annähernd gleich groß ist. Die Mehrpunktmessung wird vorzugsweise als Endpunktmessung durchgeführt, obwohl kinetische Messungen auch möglich sind.

10

Die Bestimmung des Albumingehalts nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt durch optische Messung über eine Farbstoffreaktion. Vorzugsweise erfolgt die Bestimmung des Albumingehalts nach der Bromcresolgrün- oder Bromcresolpurpur-Methode.

15

Durch Untersuchungen konnten bisher für die Bestimmung von Albumin mit der Bromcresolgrün-Methode und einem Succinatpuffer drei bevorzugte Kombinationen von Meßwellenlängen ermittelt werden. Bei einer ersten bevorzugten Ausführungsform führt man die Bestimmung bei einer ersten Meßwellenlänge von 20 560 bis 600 nm, insbesondere von 560 bis 580 nm, besonders bevorzugt von  $570 \pm 5$  nm und am meisten bevorzugt von ca. 570 nm und bei einer zweiten Meßwellenlänge von 540 bis 552 nm, besonders bevorzugt von  $546 \pm 5$  nm und am meisten bevorzugt 25 von ca. 546 nm durch.

In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird eine erste Meßwellenlänge von 640 bis 680 nm, besonders bevorzugt von  $660 \pm 5$  nm und am meisten bevorzugt 30 von ca. 660 nm und eine zweite Meßwellenlänge von 470 bis 490 nm, besonders bevorzugt von  $480 \pm 5$  nm und am meisten bevorzugt von ca. 480 nm verwendet.

In einer dritten bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden 35 Erfindung wird eine erste Meßwellenlänge von 620 bis 640 nm, besonders bevorzugt von  $630 \pm 5$  nm und am meisten bevorzugt von 630 nm und eine zweite Meßwellenlänge von 590 bis 610 nm,

- 6 -

besonders bevorzugt von  $600 \pm 5$  nm und am meisten bevorzugt von ca. 600 nm verwendet.

Für die Bestimmung von Albumin mit der Bromcresolgrün-Methode und einem Citrat-Puffer wird bevorzugt eine erste Meßwellenlänge von 560 bis 580 nm, besonders bevorzugt von  $570 \pm 5$  nm und am meisten bevorzugt von ca. 570 nm und eine zweite Meßwellenlänge von 490 bis 520 nm, besonders bevorzugt von  $505 \pm 5$  nm und am meisten bevorzugt von ca. 505 nm verwendet.

10

Bei der Verwendung anderer Testreagenzien oder/und anderer Puffersubstanzen kann der Fachmann durch einfache Versuche, z.B. die Analysen von Diodenarray-Spektren und zeitabhängige Absorptionsmessungen, weitere geeignete Wellenlängenkombinationen identifizieren.

Mit Hilfe dieser Wellenlängenkombinationen wird überraschenderweise bei Messung einer Hämoglobin enthaltenden Probe ein zumindest weitgehend unverfälschter Wert für die Albuminkonzentration in der Probe erhalten, der anschließend nicht mehr rechnerisch korrigiert werden muß. Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann eine Wiederfindung von Albumin im Bereich von  $100 \pm 10\%$  und vorzugsweise von  $100 \pm 5\%$  erreicht werden, insbesondere bei Albuminwerten im unteren medizinischen Entscheidungsbereich von ca. 3,5 g/dl.

Die optimale Reaktionszeit für das erfindungsgemäße Verfahren kann durch einfache Vorversuche aus einem Absorptions/Zeit-Diagramm, in dem der Reaktionsverlauf dargestellt ist, abgeleitet werden und liegt im allgemeinen im Bereich von 0,2 - 10 min. Für die Bestimmung von Albumin mit der Bromcresolgrün-Methode in einem Succinat-Puffer wurde bei einer Probe, die Hämoglobin aus Hämolyse enthält, festgestellt, daß bei Messung bei der Wellenlängenkombination (a) das Meßsignal innerhalb einer Reaktionszeit von 1 - 10 min im wesentlichen konstant bleibt, so daß die Messung zu beliebigen Zeitpunkten innerhalb dieses Bereichs oder gegebenenfalls auch danach erfolgen kann.

- 7 -

Bei einer Probe, die als Blutersatzmittel ein vernetztes Hämoglobin, z.B. Diaspirin-crosslinked (DCL) Hämoglobin enthält, führt man eine Einpunktmessung mit einem Monoreagenz bei der Wellenlängenkombination (a) vorzugsweise nach einer Reaktionszeit von 3 - 10 min, besonders bevorzugt von 5 - 7 min und am meisten bevorzugt von ca. 6 min durch. Bei der Wellenlängenkombination (b) führt man hingegen die Messung vorzugsweise nach einer Reaktionszeit von 1 - 4 min, besonders bevorzugt von 2 - 3 min und am meisten bevorzugt von ca. 2,5 min nach dem Reaktionsstart durch.

Bei einer Probe, die als Blutersatzmittel rekombinant hergestelltes Hämoglobin enthält, wird eine Einpunktmessung mit einem Monoreagenz bei der Wellenlängenkombination (a) vorzugsweise nach einer Reaktionszeit von 1 - 3 min, besonders bevorzugt nach 1 - 2 min und am meisten bevorzugt nach ca. 1,5 min durchgeführt. Bei der Wellenlängenkombination (b) erfolgt eine Einpunktmessung vorzugsweise nach einer Reaktionszeit von 1 - 4 min.

20

Für die Bestimmung von Albumin mit der Bromcresolgrün-Methode in einem Citrat-Puffer wird bei einer Probe, die DCL-Hämoglobin enthält, die Analytwert-Messung bei einem Monoreagenz vorzugsweise nach 20 bis 90 sec und besonders bevorzugt nach 30 bis 60 sec und bei einem 2-Reagenzientest vorzugsweise nach 0,2 bis 5 min nach Zugabe von Reagenz 2 (Startreagenz) durchgeführt.

Auch für die Bestimmung von Albumin mit der Bromcresolpurpur-Methode konnten zwei bevorzugte Kombinationen von Meßwellenlängen ermittelt werden, bei der eine Störung durch freies Hämoglobin in der Probe weitgehend beseitigt werden kann. Bei einer ersten bevorzugten Ausführungsform führt man die Bestimmung bei einer ersten Meßwellenlänge von 560 bis 580 nm, besonders bevorzugt von  $570 \pm 5$  nm und am meisten bevorzugt von ca. 570 nm und bei einer zweiten Meßwellenlänge von 490 bis

- 8 -

520 nm, besonders bevorzugt  $505 \pm 5$  nm und am meisten bevorzugt von ca. 505 nm durch.

Bei einer zweiten bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden  
5 Erfindung wird eine erste Meßwellenlänge von 560 bis 580 nm, besonders bevorzugt von  $570 \pm 5$  nm und am meisten bevorzugt von ca. 570 nm und eine zweite Meßwellenlänge von 540 bis 552 nm, besonders bevorzugt von  $546 \pm 5$  nm und am meisten bevorzugt von ca. 546 nm verwendet.

10

Bei einer Probe, die als Blutersatzmittel ein vernetztes Hämoglobin, z.B. DCL-Hämoglobin enthält, wird die Analytwert-Messung bei einem 2-Reagenzientest vorzugsweise 0,2 bis 8 min, besonders bevorzugt ca. 5 min nach Zugabe von Reagenz 2  
15 (Startreagenz) durchgeführt. Die Probenleerwert-Messung wird bei der ersten Wellenlängenkombination (570/546 nm) vorzugsweise 1 bis 4 min, besonders bevorzugt ca. 2,5 min nach Zugabe von Reagenz 1 zur Probe durchgeführt. Bei der zweiten Wellenlängenkombination erfolgt die Probenleerwertmessung vorzugs-  
20 weise 0,2 bis 4 min, besonders bevorzugt 0,2 bis 1 min und am meisten bevorzugt ca. 0,5 min nach Zugabe von Reagenz 1 zur Probe.

Entscheidend für das erfindungsgemäße Verfahren ist jedoch die  
25 neuartige Kombination von Haupt- und Meßwellenlänge. Die Messung bei unterschiedlichen optimalen Meßzeitpunkten für verschiedene Hb-Arten kann jedoch zu einer weiteren Verringerung des Meßfehlers verwendet werden.

30 Auf diese Weise ist es erstmals möglich, ohne zusätzliche Ermittlung des Hämoglobingehaltes oder Hämolysegrads und ohne anschließende rechnerische Korrektur eines durch Hämoglobin verfälschten Analysenergebnisses den korrekten Albumingehalt in nur einem Meßschritt, d.h. als 1-Punkt-Messung zu bestimmen.  
35 Ein weiterer entscheidender Vorteil ist es, daß die Bestimmung korrekter Albuminwerte auch mit einem Monoreagenz

- 9 -

möglich ist. Dies ist mit erheblichen Handhabungs- und Preisvorteilen verbunden.

Ein 2-Reagenzientest kann weiterhin verwendet werden, ist jedoch nicht mehr zwingend erforderlich. Aber auch für einen 2-Reagenzientest ergibt sich durch die vorliegende Erfindung der Vorteil, daß die Ermittlung des Hämolysegrades mit anschließender rechnerischer Korrektur der durch Hämoglobin verfälschten Meßwerte für Albumin vermieden werden kann.

10

Als Hämoglobin-enthaltende Proben werden üblicherweise Serum- oder Plasmaproben verwendet. Dabei ist anzumerken, daß die Bezeichnung "freies Hämoglobin" im Sinne der vorliegenden Erfindung sich sowohl auf hämolytische Proben als auch auf Proben bezieht, denen eine Hämoglobin-analoge Verbindung als Blutersatzmittel, z.B. ein modifiziertes, polymerisiertes oder/und quervernetztes Derivat von Human- oder Rinderhämoglobin, z.B. Diaspirin-crosslinked (DCL)-Hämoglobin, oder auch ein rekombinant hergestelltes Hämoglobin zugesetzt worden ist.

20

Bevorzugt ist es außerdem, daß das erfindungsgemäße Verfahren an einem Analyseautomaten durchgeführt wird. Ein Beispiel für einen geeigneten Analyseautomaten ist das Boehringer Mannheim/Hitachi 717-Gerät.

25

Weiterhin soll die vorliegende Erfindung durch Abbildungen und Beispiele erläutert werden.

Es zeigen:

30

Abb. 1 den zeitabhängigen Verlauf des Meßsignals bei der Bestimmung von Albumin mit einem Monoreagenz bei einer Meßwellenlängenkombination 546/570 nm (Succinatpuffer) in Anwesenheit von vernetztem Hämoglobin (DCL-Hb) gemäß vorliegender Erfindung,

35

- Abb. 2      den zeitabhängigen Verlauf des Meßsignals bei der  
Bestimmung von Albumin mit einem Monoreagenz bei  
einer Meßwellenlängenkombination 700/600 nm (Succi-  
natpuffer) in Anwesenheit von vernetztem Hämoglobin  
(DCL-Hb) gemäß dem Stand der Technik,
- Abb. 3      den zeitabhängigen Verlauf des Meßsignals bei der  
Bestimmung von Albumin mit einem Monoreagenz bei  
einer Meßwellenlängenkombination 546/570 nm (Succi-  
natpuffer) in Anwesenheit von rekombinant herge-  
stelltem Hämoglobin gemäß vorliegender Erfindung und
- Abb. 4      den zeitabhängigen Verlauf des Meßsignals bei der  
Bestimmung von Albumin mit einem Monoreagenz bei  
einer Meßwellenlängenkombination 546/570 nm (Succi-  
natpuffer) in Anwesenheit von Hämoglobin aus Hämolyse gemäß vorliegender Erfindung,
- Abb. 5      den zeitabhängigen Verlauf des Meßsignals bei der  
Bestimmung von Albumin mit einem Monoreagenz bei  
einer Meßwellenlängenkombination 480/660 nm (Succi-  
natpuffer) in Anwesenheit von DCL-Hämoglobin gemäß  
vorliegender Erfindung,
- Abb. 6      den zeitabhängigen Verlauf des Meßsignals bei der  
Bestimmung von Albumin mit einem Monoreagenz bei  
einer Meßwellenlängenkombination 700/600 nm (Citrat-  
puffer) in Anwesenheit von DCL-Hämoglobin gemäß dem  
Stand der Technik,
- Abb. 7      den zeitabhängigen Verlauf des Meßsignals bei der  
Bestimmung von Albumin mit einem Monoreagenz bei  
einer Meßwellenlängenkombination 505/570 nm (Citrat-  
puffer) in Anwesenheit von DCL-Hämoglobin gemäß vor-  
liegender Erfindung,

- Abb. 8      den zeitabhängigen Verlauf des Meßsignals bei der Bestimmung von Albumin mit einem Zweireagenzientest bei einer Meßwellenlängenkombination 505/570 nm (Citratpuffer) in Anwesenheit von DCL-Hämoglobin gemäß vorliegender Erfindung,
- Abb. 9      den zeitabhängigen Verlauf des Meßsignals bei der Bestimmung von Albumin nach der Bromcresolpurpur-Methode mit einem Zweireagenzientest bei einer Meßwellenlängenkombination 700/600 nm in Anwesenheit von DCL-Hämoglobin gemäß dem Stand der Technik,
- Abb. 10     den zeitabhängigen Verlauf des Meßsignals bei der Bestimmung von Albumin nach der Bromcresolpurpur-Methode mit einem Zweireagenzientest bei einer Meßwellenlängenkombination 505/570 nm in Anwesenheit von DCL-Hämoglobin gemäß vorliegender Erfindung,
- Abb. 11     den zeitabhängigen Verlauf des Meßsignals bei der Bestimmung von Albumin nach der Bromcresolpurpur-Methode mit einem Zweireagenzientest bei einer Meßwellenlängenkombination 546/570 nm in Anwesenheit von DCL-Hämoglobin gemäß vorliegender Erfindung,
- Abb. 12     ein Diodenarray-Spektrum für die Bestimmung von Albumin mit einem Monoreagenz (Succinatpuffer) und
- Abb. 13     ein Diodenarray-Spektrum für die Bestimmung von Albumin mit einem Monoreagenz (Citratpuffer).

#### Beispiel 1

Es wurde eine Bestimmung von Albumin mit einem Monoreagenz nach der Bromcresolgrün-Methode (Dumas et al., Clin. Chim. Acta 31 (1971), 87-96) in einem Succinatpuffer durchgeführt. Als Reagenz wurde verwendet:

Succinatpuffer 75 mmol/l, pH 4,2; 0,15 mmol/l Bromcresolgrün

Die Testdurchführung war wie folgt:

- 5 Zu 3  $\mu$ l Probe wurden 350  $\mu$ l Reagenz gegeben und dann der zeitabhängige Verlauf des Meßsignals (mE) bestimmt.

Die Bestimmung erfolgte in einem Boehringer Mannheim/Hitachi 717-Analysegerät unter Verwendung der Meßwellenlängenkombinationen 700/600 nm (Stand der Technik) sowie 546/570 nm bzw. 10 480/660 nm (Erfindung).

Der zeitabhängige Verlauf des Meßsignals für Proben ohne Hämoglobin, mit 1000 mg/dl Hämoglobin und mit 2000 mg/dl Hämoglobin in Form von vernetztem Hämoglobin (DCL-Hb) ist für die 15 Wellenlängenkombination 546/570 nm in Abb. 1 und für die Wellenlängenkombination 700/600 nm in Abb. 2 dargestellt.

Es ist zu erkennen, daß bei der Wellenlängenkombination 20 546/570 nm mit zunehmender Reaktionsdauer eine Abnahme des Meßsignals bei den hämoglobinhaltigen Proben gefunden wird, während das Meßsignal für die Probe ohne Hämoglobin im wesentlichen konstant bleibt. Die bevorzugte Reaktionsdauer, bei der das Meßsignal dem Signal einer Hb-freien Probe entspricht, ist 25 ca. 5-7 min. Abb. 2 zeigt, daß bei Verwendung der Meßwellenlängenkombination 700/600 nm sowohl die Signale der hämoglobinfreien Probe als auch die Signale der Hämoglobin enthaltenden Proben im wesentlichen konstant bleiben.

30 In Tabelle 1 ist die prozentuale Wiederfindung des Albumingehalts in Proben mit unterschiedlichem Hämoglobingehalt gezeigt. Bei der Meßwellenlängenkombination 700/600 nm gemäß Stand der Technik (Messung nach einer Reaktionsdauer von 80 s) wurde mit zunehmendem Hämoglobingehalt eine starke Meßwertverfälschung festgestellt. Bei den erfindungsgemäßen Meßwellenlängenkombinationen 546/570 nm (Messung nach einer Reaktionsdauer von 340 s) und 480/660 nm (Messung nach einer Reaktions-



dauer von 140 s) wurde hingegen eine vom Hämoglobingehalt der Probe unabhängige Wiederfindung von  $100 \pm 2 \%$  erreicht.

Abb. 3 zeigt den zeitabhängigen Verlauf des Meßsignals für  
5 Proben ohne Hb sowie mit 1000 bzw. 2000 mg/dl rekombinant  
hergestelltem Hämoglobin für die Wellenlängenkombination  
546/570 nm. Die bevorzugte Reaktionsdauer ist ca. 1-2 min.

Abb. 4 zeigt den zeitabhängigen Verlauf des Meßsignals für  
10 Proben ohne Hb sowie mit 1000 mg/dl Hämoglobin aus Hämolyse.

Abb. 5 zeigt den zeitabhängigen Verlauf des Meßsignals für  
Proben ohne Hb sowie mit 1000 mg/dl bzw. 2000 mg/dl Hb bei der  
erfindungsgemäßen Meßwellenkombination 480/660 nm. Die bevor-  
15 zugte Reaktionsdauer, bei der das Meßsignal der DCL-Hb-haltigen  
Probe dem Signal einer Hb-freien Probe entspricht ist ca.  
1 - 3 min.

Bei Proben, die Hämoglobin aus Hämolyse oder rekombinant her-  
20 gestelltes Hämoglobin enthalten, konnte unter Verwendung der  
erfindungsgemäßen Wellenlängenkombination 480/660 nm ebenfalls  
eine gute Entstörung erreicht werden.

### Beispiel 2

25

Es wurde eine Bestimmung von Albumin mit einem Monoreagenz  
nach der Bromcresolgrün-Methode in einem Citratpuffer  
(95 mmol/l, pH 4,1; 0,11 mmol/l Bromcresolgrün; Detergenz)  
durchgeführt.

30

Die Testdurchführung war wie in Beispiel 1 beschrieben. Die  
Bestimmung erfolgte unter Verwendung von Meßwellenlängenkom-  
binationen 700/600 nm (Stand der Technik) und 505/570 nm (Er-  
findung) sowie einem Meßzeitpunkt von 80 s (Stand der Technik)  
35 und 40 - 60 s, bevorzugt 50 s nach Reaktionsstart (Erfindung).

Der zeitabhängige Verlauf des Meßsignals für Proben ohne Hämoglobin, mit 1000 mg/dl Hämoglobin und mit 2000 mg/dl Hämoglobin in Form von DCL-Hämoglobin ist für die Wellenlängenkombination 700/600 nm in Abbildung 6 und für die Wellenlängen-  
5 kombination 505/570 nm in Abbildung 7 dargestellt.

Es ist zu erkennen, daß bei der erfindungsgemäßen Wellenlängenkombination 505/570 nm mit zunehmender Reaktionsdauer eine Abnahme des Meßsignals bei den hämoglobinhaltigen Proben ge-  
10 funden wird, während das Meßsignal für die Probe ohne Hämoglobin im wesentlichen konstant bleibt. Bevorzugte Reaktionsdauer, bei der das Meßsignal dem Signal einer Hb-freien Probe entspricht, ist ca. 20 - 90 s.

15 In Tabelle 2 ist die prozentuale Wiederfindung des Albumingehalts in Proben mit unterschiedlichem Hämoglobingehalt gezeigt. Bei der erfindungsgemäßen Meßwellenlängenkombination 505/570 nm (Messung nach einer Reaktionsdauer von 60 s) wurde eine vom Hämoglobingehalt der Probe unabhängige Wiederfindung  
20 von  $100 \pm 5 \%$  erreicht, während bei der Meßwellenkombination 700/600 nm des Standes der Technik bei zunehmendem Hämoglobingehalt eine starke Meßwertverfälschung festgestellt wurde.

Bei Proben, die Hämoglobin aus Hämolyse oder rekombinant her-  
25 gestelltes Hämoglobin enthalten, konnte unter Verwendung der erfindungsgemäßen Wellenlängenkombination ebenfalls eine gute Entstörung erreicht werden.

### Beispiel 3

30

Es wurde eine Bestimmung von Albumin nach der Bromcresolgrün-Methode in einem Citratpuffer mit einem 2-Reagenzientest durchgeführt. Als Reagenzien wurden verwendet:

35 Reagenz 1: Citratpuffer 95 mmol/l, pH 4,1; Detergenz  
Reagenz 2: Citratpuffer 95 mmol/l, pH 4,1;  
0,66 mmol/l Bromcresolgrün; Detergenz

Die Testdurchführung war wie folgt:

Zu 3  $\mu$ l Probe wurden 250  $\mu$ l Reagenz 1 gegeben und ca. 4,5 min danach der Probenleerwert  $E_1$  gemessen. Anschließend wurden 50  $\mu$ l Reagenz 2 zugegeben und 0,5 min danach der Analytmeßwert  $E_2$  gemessen. Außerdem wurde während der gesamten Zeit der zeitabhängige Verlauf des Meßsignals bestimmt. Die Bestimmung erfolgte an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 717-Analysengerät unter Verwendung der Meßwellenlängenkombination 505/570 nm (Erfindung). Als Vergleich diente das in Beispiel 2 erwähnte Monoreagenz unter Verwendung der Meßwellenlängenkombination 700/600 nm (Stand der Technik).

Der zeitabhängige Verlauf des Meßsignals für Proben ohne Hämoglobin, mit 1000 mg/dl Hämoglobin und mit 2000 mg/dl Hämoglobin in Form von DCL-Hämoglobin ist für die erfindungsgemäße Wellenlängenkombination von 505/570 nm in Abb. 8 dargestellt.

Es ist zu erkennen, daß bei einer Wellenlängenkombination von 505/570 nm eine Abnahme des Meßsignals bei den hämoglobinhaltigen Proben gefunden wird. Die bevorzugten Meßzeitpunkte werden so gewählt, daß unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors aus den Pipettiervolumina das durch Hämoglobin verursachte Störsignal an beiden Meßpunkten gleich hoch ist. Vorzugsweise wird daher  $E_1$  (Probenleerwert) ca. 4,5 min nach Zugabe von Reagenz 1 zur Probe und  $E_2$  (Analytwert) ca. 0,5 min nach Zugabe von Reagenz 2 gemessen.

In Tabelle 3 ist die prozentuale Wiederfindung des Albumingehalts in Proben mit unterschiedlichem Hämoglobingehalt gezeigt. Bei der erfindungsgemäßen Meßwellenlängenkombination 505/570 nm wurde eine vom Hämoglobingehalt der Probe unabhängige Wiederfindung von  $100 \pm 2$  % erreicht, während bei der Meßwellenlängenkombination 700/600 nm gemäß dem Stand der Technik mit zunehmendem Hämoglobingehalt eine starke Meßwertverfälschung festgestellt wurde.

Bei Proben, die Hämoglobin aus Hämolyse oder rekombinant hergestelltes Hämoglobin enthalten, konnte unter Verwendung der erfindungsgemäßen Wellenlängenkombination ebenfalls eine gute Entstörung erreicht werden.

5

#### Beispiel 4

Es wurde eine Bestimmung von Albumin nach der Bromcresolpurpur-Methode mit einem 2-Reagenzientest und mittels 2-Punktmessung durchgeführt. Als Reagenzien wurden verwendet:

Reagenz 1:       Acetat-Puffer 100 mmol/l pH 5,3, Detergenz  
Reagenz 2:       Acetat-Puffer 100 mmol/l pH 5,3, Detergenz,  
                  526  $\mu$ mol/l Bromcresolpurpur

15

Die Testdurchführung war wie folgt:

Zu 3  $\mu$ l Probe wurden 250  $\mu$ l Reagenz 1 gegeben und ca. 2,5 min danach der Probenleerwert  $E_1$  gemessen. Anschließend wurden  
20 150  $\mu$ l Reagenz 2 zugegeben und ca. 5 min danach der Analytmeßwert  $F$  gemessen. Außerdem wurde während der gesamten Zeit der zeitabhängige Verlauf des Meßsignals bestimmt.

Die Bestimmung erfolgte an einem Boehringer Mannheim/Hitachi  
25 717-Analysengerät unter Verwendung der Meßwellenlängenkombinationen 700/600 nm (Stand der Technik) sowie 505/570 nm bzw. 546/570 nm (Erfindung).

Der zeitabhängige Verlauf des Meßsignals für Proben ohne Hämoglobin, mit 1000 mg/dl Hämoglobin und mit 2000 mg/dl Hämoglobin in Form von DCL-Hämoglobin ist für die Wellenlängenkombination 700/600 nm in Abbildung 9 für die Wellenlängenkombination 505/570 nm in Abbildung 10 und für die Wellenlängenkombination 546/570 nm in Abbildung 11 dargestellt.

35

Es ist zu erkennen, daß bei der Wellenlängenkombination 700/600 nm der durch Hämoglobin verursachte Signalanstieg nach

Zugabe von Reagenz 2 höher ist als vor Zugabe von Reagenz 2. Das ist ein Hinweis darauf, daß Hämoglobin selbst an der Reaktion mit Bromcresolpurpur teilnimmt und dadurch die Albuminbestimmung gestört wird. Das Meßsignal der hämoglobinhaltigen Proben wie auch der Probe ohne Hämoglobin ist jedoch vor Zugabe von Reagenz 2 wie auch nach Zugabe von Reagenz 2 nahezu konstant.

Demgegenüber ist bei der erfindungsgemäßen Wellenlängenkombination 505/570 nm mit zunehmender Reaktionsdauer eine Abnahme des Meßsignals bei den hämoglobinhaltigen Proben zu erkennen, während das Signal für die Probe ohne Hämoglobin im wesentlichen konstant bleibt. Zur Vermeidung von Störungen durch Hämoglobin sind die bevorzugten Reaktionszeitpunkte deshalb so zu wählen, daß unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors das durch Hämoglobin verursachte Störsignal vor Zugabe von Reagenz 2 gleich oder annähernd gleich groß ist, wie das durch Hämoglobin verursachte Störsignal nach Zugabe von Reagenz 2. Im Beispiel 4 wird deshalb  $E_1$ , ca. 2,5 min (505/570 nm) bzw. 0,5 min (546/570 nm) nach Zugabe von Reagenz 1 zur Probe und  $E_2$  bei beiden Wellenlängenkombinationen ca. 5 min nach Zugabe von Reagenz 2 gemessen.

In Tabelle 4 ist die prozentuale Wiederfindung des Albumingehaltes in Proben mit unterschiedlichem Hämoglobingehalt gezeigt. Bei den erfindungsgemäßen Meßwellenlängenkombinationen 505/570 nm und 546/570 nm wurde eine vom Hämoglobingehalt der Probe unabhängige Wiederfindung von  $100 \pm 4$  % erreicht, während bei der Meßwellenlängenkombination 700/600 nm gemäß dem Stand der Technik mit zunehmendem Hämoglobingehalt eine starke Meßwertverfälschung festgestellt wurde.

Bei Proben, die Hämoglobin aus Hämolyse oder rekombinant hergestelltes Hämoglobin enthalten, konnte unter Verwendung der erfindungsgemäßen Wellenlängenkombinationen ebenfalls eine gute Entstörung erreicht werden.

Beispiel 5

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen wellenlängenabhängige Diodenarray-Spektren der Bestimmung von Albumin nach der Bromcresolgrün-Methode mit einem Monoreagenz in einem Succinat- bzw. Citratpuffer. Probe 1 ist eine Kontrolle mit 0,9 % NaCl. Probe 2 ist Serum + NaCl und Probe 2 ist Serum + DCL-Hämoglobin. Die Reaktionszeit war jeweils 90 s.

- 10 Aus Abb. 12 ist ersichtlich, daß neben den in Beispiel 1 angegebenen bevorzugten Wellenlängenkombinationen 546/570 bzw. 480/660 nm noch eine weitere Wellenlängenkombination 600/630 nm geeignet ist.

15

# Albumin BCG (Succinat-Puffer)

## Einfluß von Hämoglobin (DCI-Hb)

Hb (DCI-Hb) [mg/dl]	Monoreagenz 700/600 nm, Meßpunkt 8 *		Monoreagenz 546/570 nm, Meßpunkt 30 *		Monoreagenz 480/660 nm, Meßpunkt 13 *	
	Albumin [g/dl]	Wiederfindung [%]	Albumin [g/dl]	Wiederfindung [%]	Albumin [g/dl]	Wiederfindung [%]
0	3.07	100	3.18	100	3.75	100
200	3.23	105	3.26	102	3.83	102
400	3.41	111	3.21	101	3.84	102
600	3.50	114	3.19	100	3.83	102
800	3.70	120	3.22	101	3.83	102
1000	3.77	123	3.18	100	3.83	102
1200	3.99	130	3.19	100	3.84	102
1400	4.13	135	3.18	100	3.82	102
1600	4.25	138	3.16	99	3.84	102
1800	4.37	143	3.18	100	3.83	102
2000	4.48	146	3.11	98	3.76	100

\* Instrument: BM/Hitachi 717

Tab.1

Tab.2

# Albumin BCG (Citrat-Puffer)

## Einfluß von Hämoglobin (DCI-Hb)

Hb (DCI-Hb) [mg/dl]	Monoreagenz 700/600 nm, Meßpunkt 5 *		Monoreagenz 505/570 nm, Meßpunkt 4 *	
	Albumin [g/dl]	Wiederfindung [%]	Albumin [g/dl]	Wiederfindung [%]
0	3.55	100	3.71	100
200	3.85	108	3.63	98
400	4.12	116	3.53	95
600	4.41	124	3.51	95
800	4.72	133	3.54	95
1000	4.96	140	3.52	95
1200	5.23	147	3.55	96
1400	5.54	156	3.57	96
1600	5.81	164	3.67	99
1800	6.12	172	3.80	102
2000	6.29	177	3.76	101

\* Instrument: BM/Hitachi 911



Tab.3

# Albumin BCG (Citrat-Puffer)

## Einfluß von Hämoglobin (DCI-Hb)

Hb (DCI-Hb) [mg/dl]	Monoreagenz 700/600 nm, Meßpunkt 8 *		2-Reagenzien-Test 505/570 nm, Meßpunkte 24-27 *	
	Albumin [g/dl]	Wiederfindung [%]	Albumin [g/dl]	Wiederfindung [%]
0	3.61	100	3.63	100
200	3.93	109	3.68	101
400	4.16	115	3.68	101
600	4.46	124	3.67	101
800	4.72	131	3.67	101
1000	5.00	139	3.69	102
1200	5.25	145	3.65	100
1400	5.50	152	3.65	100
1600	5.70	158	3.64	100
1800	5.95	165	3.62	100
2000	6.16	171	3.58	99

\* Instrument: BM/Hitachi 717

Tab.4

# Albumin BCP

## Einfluß von Hämoglobin (rec-Hb)

Hb (rec-Hb) [mg/dl]	2-Reagenzien-Test 700/600 nm, Meßpunkte 24-50 *		2-Reagenzien-Test 505/570 nm, Meßpunkte 14-50 *	
	Albumin [g/dl]	Wiederfindung [%]	Albumin [g/dl]	Wiederfindung [%]
0	3.04	100	2.95	100
200	3.05	101	2.85	97
400	3.11	102	2.82	96
600	3.21	106	2.84	96
800	3.34	110	2.87	97
1000	3.44	113	2.89	98
1200	3.57	118	2.94	100
1400	3.61	119	2.97	101
1600	3.62	119	2.94	100
1800	3.74	123	2.96	100
2000	3.90	128	2.99	102

\* Instrument: BM/Hitachi 717

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von Albumin in einer freies  
5 Hämoglobin enthaltenden Probe durch optische Messung bei  
mindestens zwei Wellenlängen,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß  
(a) bei einer ersten Meßwellenlänge ein zur Bestimmung  
10 ausreichend hohes Meßsignal für Albumin vorliegt,  
(b) bei einer zweiten Meßwellenlänge (i) kein Meßsignal  
für Albumin oder (ii) eine im Vergleich zum Meßsi-  
gnal bei der ersten Meßwellenlänge geringeres Meßsi-  
15 gnal für Albumin vorliegt und  
(c) bei der ersten und bei der zweiten Meßwellenlänge  
ein vergleichbar hohes Störsignal vorliegt, das  
durch eine Reaktion von Hämoglobin mit dem zur Be-  
20 stimmung von Albumin verwendeten Testreagenz erzeugt  
wird und sich zeitabhängig ändert.
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
25 daß die Bestimmung als Einpunktmessung durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß der Meßzeitpunkt so gewählt wird, daß das durch die  
30 Reaktion von Hämoglobin mit dem Testreagenz verursachte  
Störsignal bei der ersten und bei der zweiten Meßwellen-  
länge gleich oder annähernd gleich groß ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1,  
35 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß die Bestimmung als Zwei- oder Mehrpunktmessung durch-  
geführt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß die Meßzeitpunkte so gewählt werden, daß unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors das durch Hämoglobin verursachte Störsignal an den Meßzeitpunkten jeweils  
5 gleich oder annähernd gleich groß ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
10 daß man die Bestimmung von Albumin mit der Bromcesolgrün-Methode in einem Succinat-Puffer durchführt.
7. Verfahren nach Anspruch 6,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
15 daß man die Bestimmung  
(a) bei einer ersten Meßwellenlänge von 560 - 580 nm und  
bei einer zweiten Meßwellenlänge von 540 - 552 nm,  
(b) bei einer ersten Meßwellenlänge von 640 - 680 nm und  
bei einer zweiten Meßwellenlänge von 470 - 490 nm  
20 oder  
(c) bei einer ersten Meßwellenlänge von 620 - 640 nm und  
bei einer zweiten Meßwellenlänge von 590 - 610 nm  
durchführt.
- 25 8. Verfahren nach Anspruch 7,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man die Bestimmung  
(a) bei einer ersten Meßwellenlänge von  $570 \pm 5$  nm und  
bei einer zweiten Meßwellenlänge von  $546 \pm 5$  nm,  
30 (b) bei einer ersten Meßwellenlänge von  $660 \pm 5$  nm und  
bei einer zweiten Meßwellenlänge von  $480 \pm 5$  nm,  
(c) bei einer ersten Meßwellenlänge von  $630 \pm 5$  nm und  
bei einer zweiten Meßwellenlänge von  $600 \pm 5$  nm  
durchführt.

9. Verfahren nach Anspruch 8,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man die Bestimmung  
(a) bei einer ersten Meßwellenlänge von ca. 570 nm und  
s bei einer zweiten Meßwellenlänge von ca. 546 nm,  
(b) bei einer ersten Meßwellenlänge von ca. 660 nm und  
bei einer zweiten Meßwellenlänge von ca. 480 nm oder  
(c) bei einer ersten Meßwellenlänge von ca. 630 nm und  
10 bei einer zweiten Meßwellenlänge von ca. 600 nm  
durchführt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man die Bestimmung von Albumin mit der Bromcresol-  
15 grün-Methode in einem Citrat-Puffer durchführt.
11. Verfahren nach Anspruch 10,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man die Bestimmung bei einer ersten Meßwellenlänge  
20 von 560 bis 580 nm und bei einer zweiten Meßwellenlänge  
von 490 bis 520 nm durchführt.
12. Verfahren nach Anspruch 11,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
25 daß man die Bestimmung bei einer ersten Meßwellenlänge  
von  $570 \pm 5$  nm und bei einer zweiten Meßwellenlänge von  
 $505 \pm 5$  nm durchführt.
13. Verfahren nach Anspruch 12,  
30 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man die Bestimmung bei einer ersten Meßwellenlänge  
von ca. 570 nm und bei zweiten Meßwellenlänge von ca.  
505 nm durchführt.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man die Bestimmung von Albumin mit der Bromcresolpur-  
pur-Methode durchführt.
- 5 15. Verfahren nach Anspruch 14,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man die Bestimmung (a) bei einer ersten Meßwellen-  
länge von 560 bis 580 nm und bei einer zweiten Meßwellen-  
10 länge von 490 bis 520 nm oder (b) bei einer ersten Meß-  
wellenlänge von 560 bis 580 nm und bei einer zweiten Meß-  
wellenlänge von 540 bis 552 durchführt.
16. Verfahren nach Anspruch 15,  
15 dadurch gekennzeichnet,  
daß man die Bestimmung (a) bei einer ersten Meßwellen-  
länge von  $570 \pm 5$  nm und bei einer zweiten Meßwellenlänge  
von  $505 \pm 5$  nm (b) bei einer ersten Meßwellenlänge von  
20  $570 \pm 5$  nm und bei einer zweiten Meßwellenlänge von  $546 \pm$   
5 nm durchführt.
17. Verfahren nach Anspruch 16,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man die Bestimmung (a) bei einer ersten Meßwellen-  
25 länge von ca. 570 nm und bei zweiten Meßwellenlänge von  
ca. 505 nm oder (b) bei einer ersten Meßwellenlänge von  
ca. 570 nm und bei bei einer zweiten Meßwellenlänge von  
546 nm durchführt.
- 30 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Messung nach einer Reaktionsdauer von 0,5 bis  
10 min. erfolgt.

- 27 -

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man eine Probe bestimmt, die Hämoglobin aus Hämolyse  
enthält.
- 5 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man eine Probe bestimmt, die vernetztes Hämoglobin  
enthält.
- 10 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man eine Probe bestimmt, die rekombinant hergestell-  
tes Hämoglobin enthält.
- 15 22. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9 und 20,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß die Bestimmung als Einpunktmessung bei der Wellenlän-  
genkombination (a) nach einer Reaktionsdauer von 5 bis 7  
20 min oder bei der Wellenlängenkombination (b) nach einer  
Reaktionsdauer von 2 bis 3 min erfolgt.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9, 19 und 21,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
25 daß die Bestimmung als Einpunktmessung bei der Wellenlän-  
genkombination (a) nach einer Reaktionsdauer von 1-2 min  
oder (b) nach einer Reaktionsdauer von 1 bis 3 min er-  
folgt.
- 30 24. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13 und 19 bis  
21,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß die Bestimmung als Einpunktmessung nach einer Reak-  
tionsdauer von 20-90 sec. durchgeführt wird.
- 35

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13 und 19 bis 21,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß die Bestimmung mit zwei Reagenzien als Zweipunktmes-  
5 sung durchgeführt wird, wobei die Messung des Analytwerts  
0,2 bis 5 min nach Zugabe des zweiten Reagenz durchge-  
führt wird.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17 und 19 bis  
10 21,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß die Bestimmung mit zwei Reagenzien als Zweipunktmes-  
sung durchgeführt wird, wobei die Messung des Analytwerts  
0,2 bis 8 min nach Zugabe des zweiten Reagenz durchge-  
15 führt wird.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 26,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß nach der Bestimmung keine rechnerische Korrektur des  
20 Analyseergebnisses stattfindet.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 27,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß die Bestimmung an einer Serum- oder Plasmaprobe  
25 durchgeführt wird.
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 28,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man das Verfahren an einem Analyseautomaten durch-  
30 führt.



# Albumin BCG (Succinat-Puffer), Monoreagenz / Einfluß von Hämoglobin (DCI-Hb)

Wellenlänge 546/570 nm (Neben/Haupt)

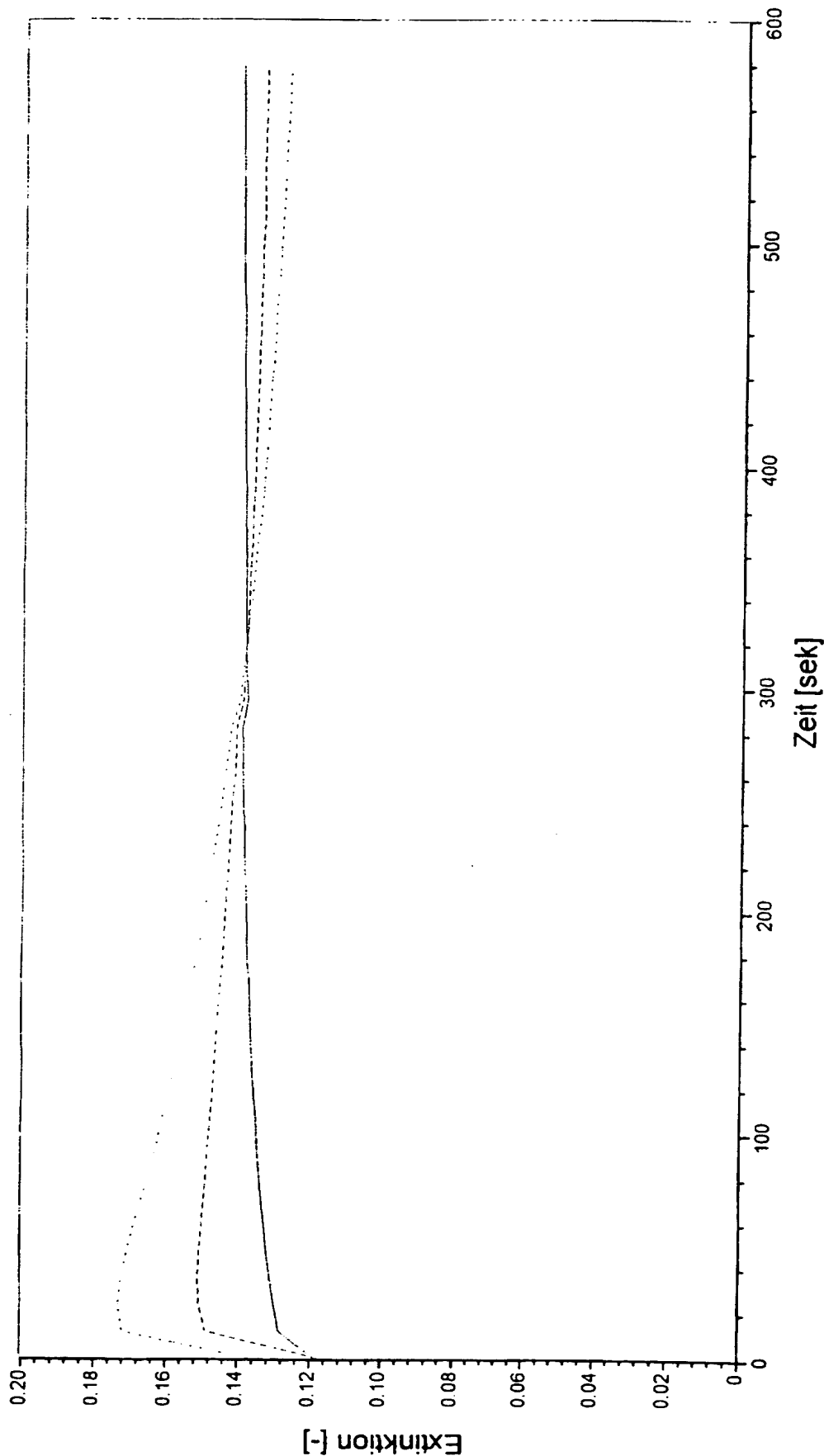


Abb. 1

— kein Hb      --- 1000mg/dl Hb      ... 2000mg/dl Hb

ERSATZBLATT (REGEL 26)

# Albumin BCG (Succinat-Puffer), Monoreagenz / Einfluß von Hämoglobin (DCI-Hb)

Wellenlänge 700/600 nm (Neben/Haupt)

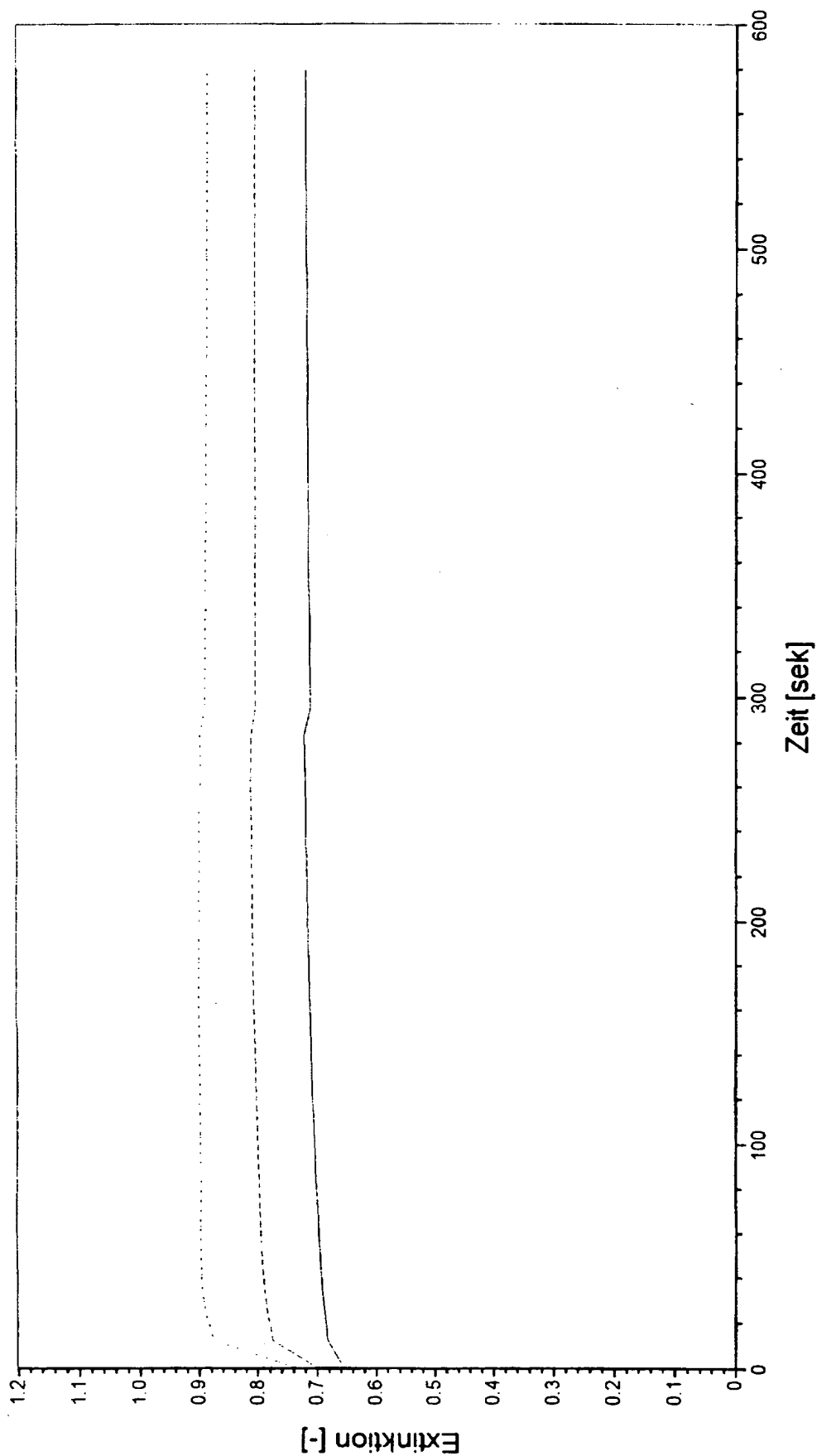


Abb. 2

ERSATZBLATT (REGEL 26)

# Albumin BCG (Succinat-Puffer), Monoreagenz / Einfluß von Hämoglobin (Rec-Hb)

Wellenlänge 546/570 nm (Neben/Haupt)

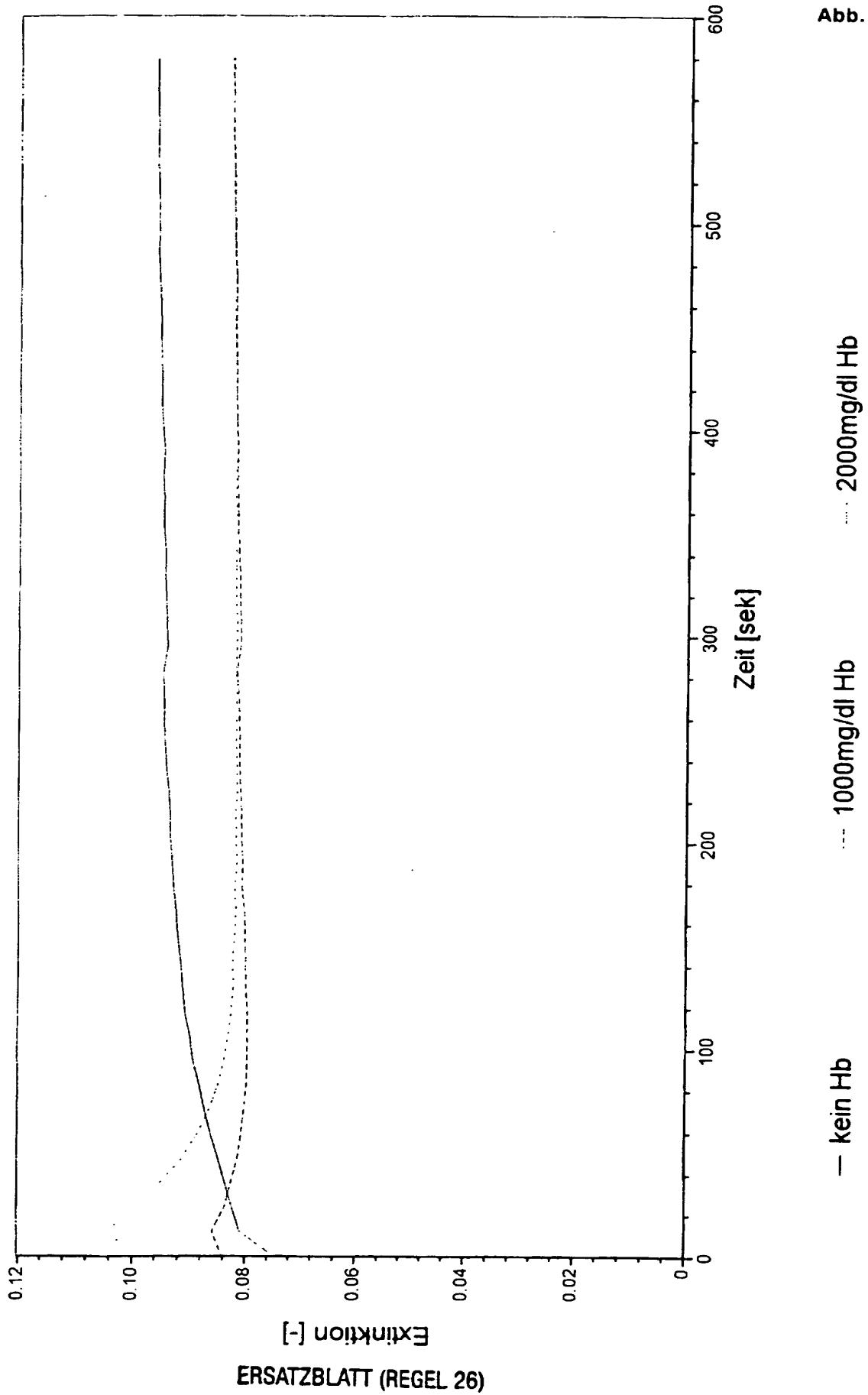


Abb. 3

# Albumin BCG (Succinat-Puffer), Monoreagenz/Einfluß von Hämoglobin (Hämolyse)

Wellenlänge 546/570 nm (Neben/Haupt)

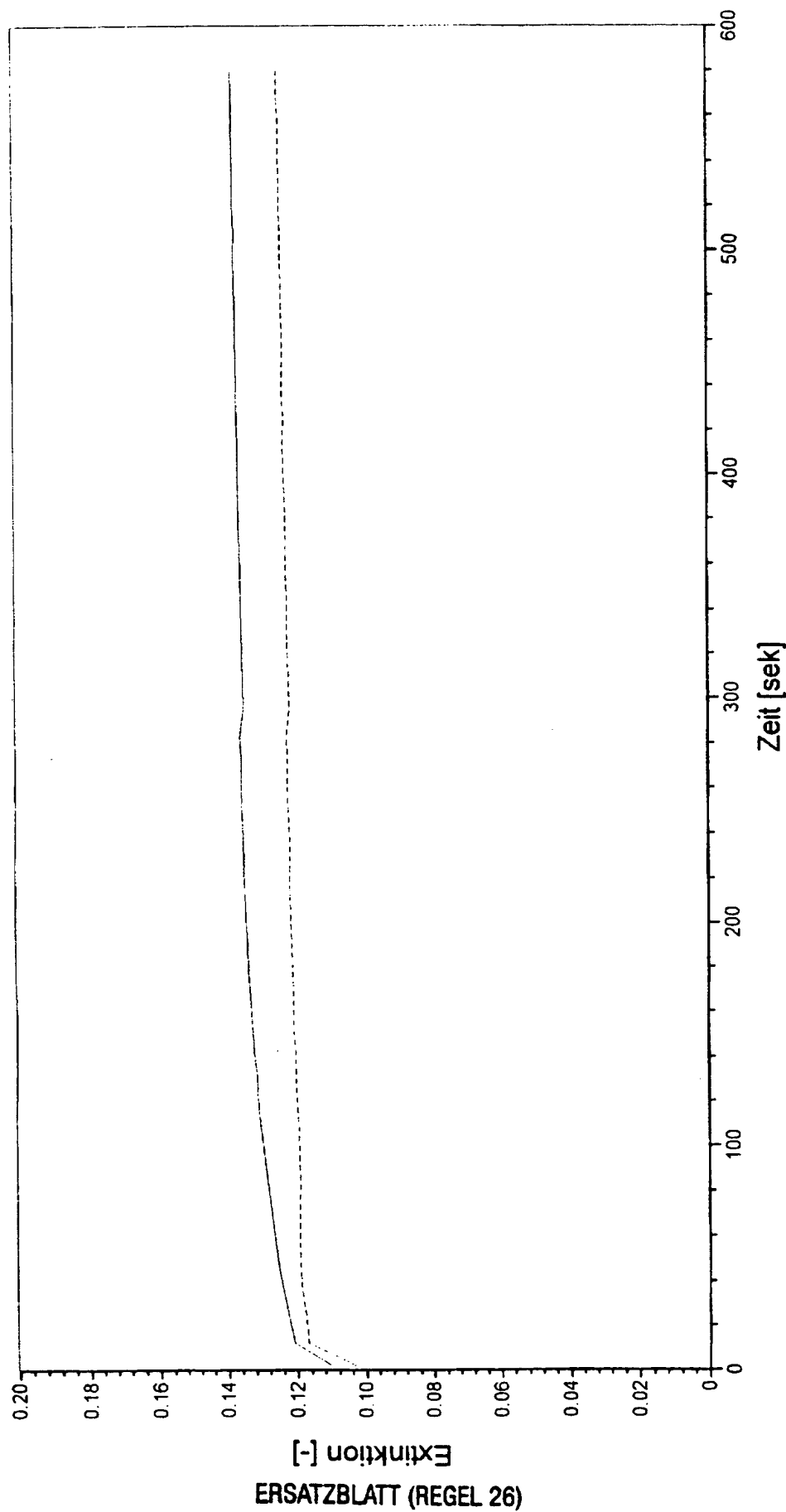


Abb. 4

# Albumin BCG (Succinat-Puffer), Monoreagenz / Einfluß von Hämoglobin (DCI-Hb)

Wellenlänge 480/660 nm (Neben/Haupt)

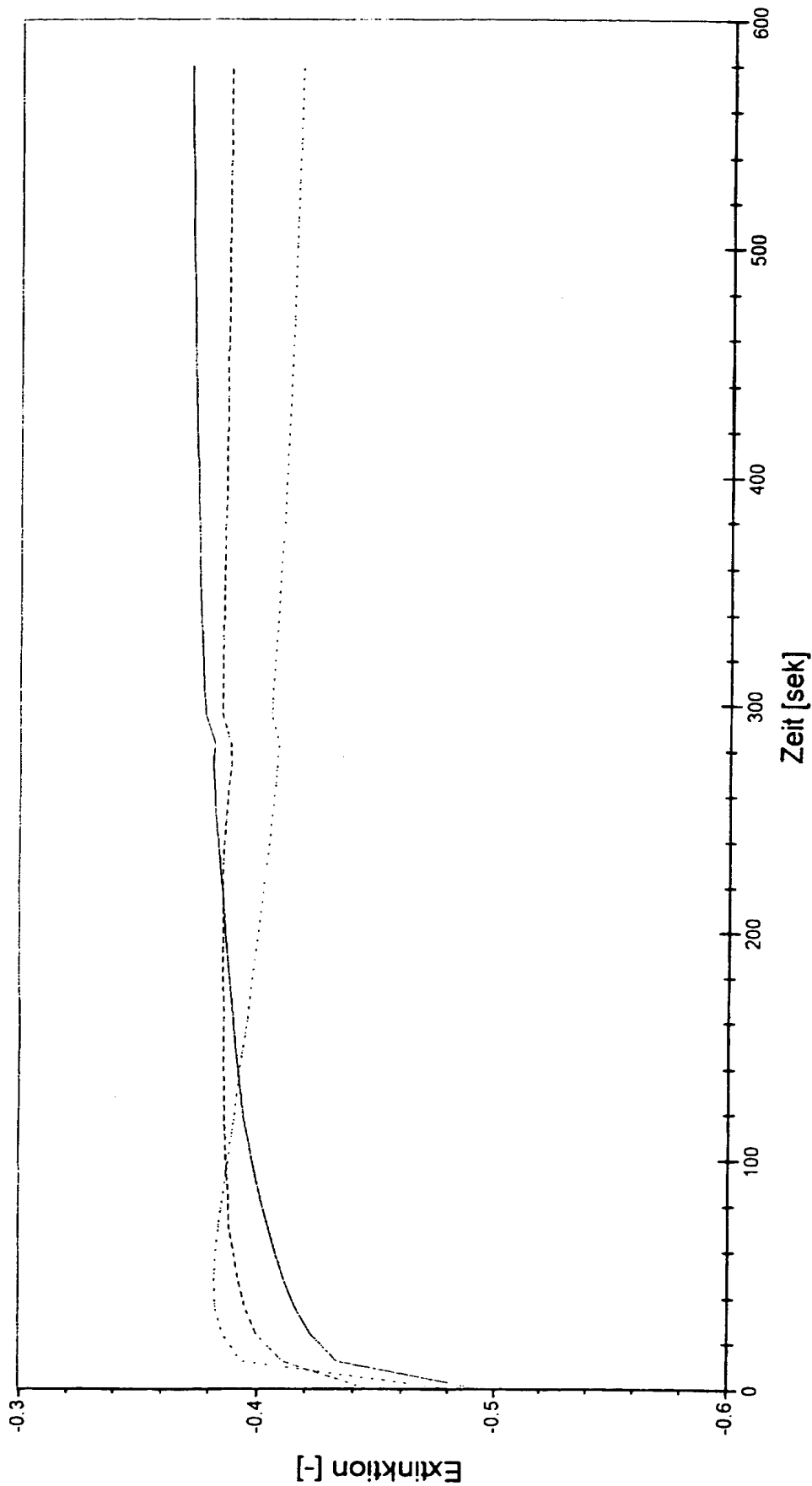


Abb. 5

ERSATZBLATT (REGEL 26)

# Albumin BCG (Citrat-Puffer), Monoreagenz / Einfluß von Hämoglobin (DCI-Hb)

Wellenlänge 700/600 nm (Neben/Haupt)

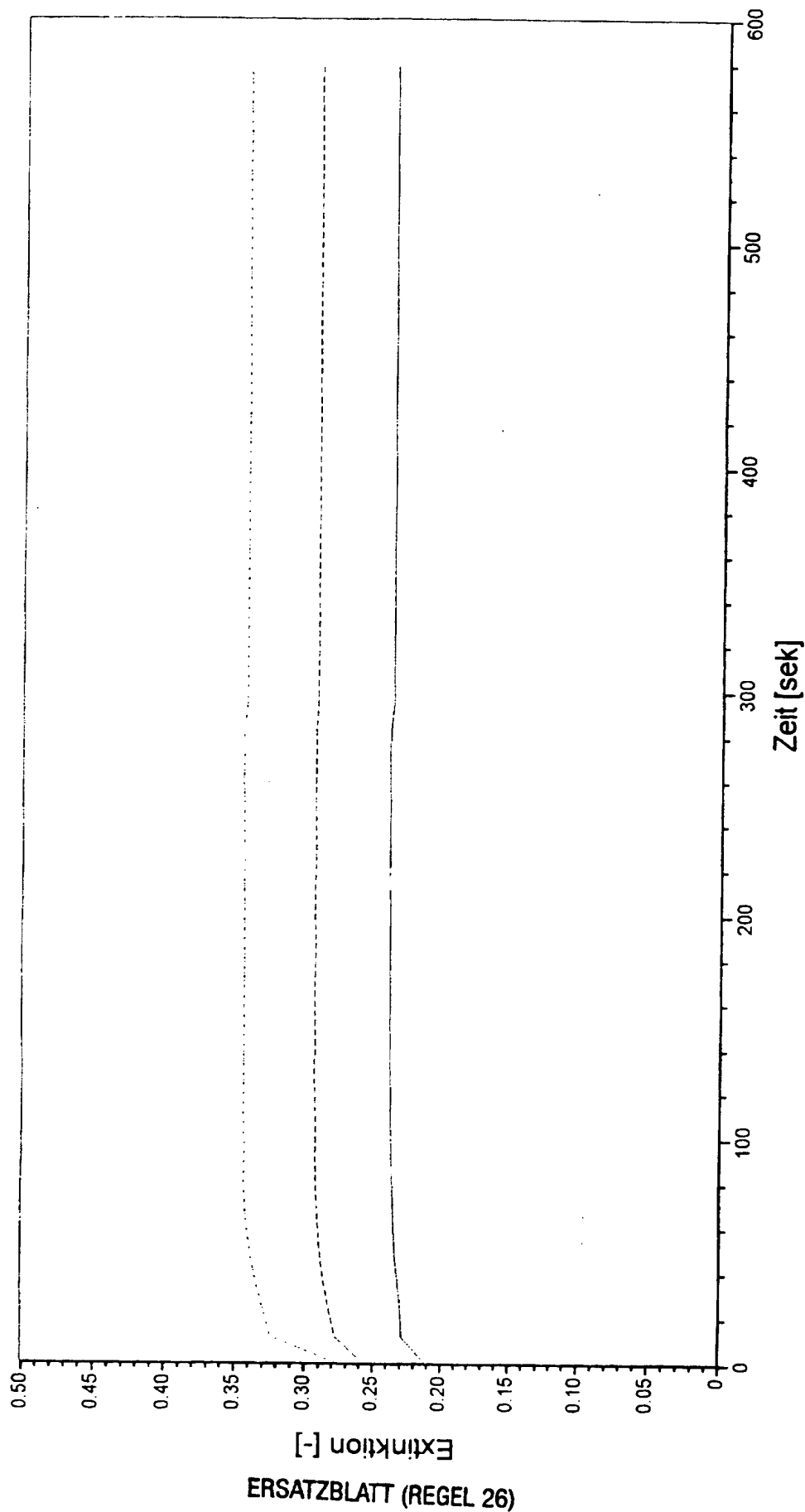


Abb. 6

— kein Hb      - - - 1000mg/dl Hb      ···· 2000mg/dl Hb

ERSATZBLATT (REGEL 26)

# Albumin BCG (Citrat-Puffer), Monoreagenz / Einfluß von Hämoglobin (DCI-Hb)

Wellenlänge 505/570 nm (Neben/Haupt)

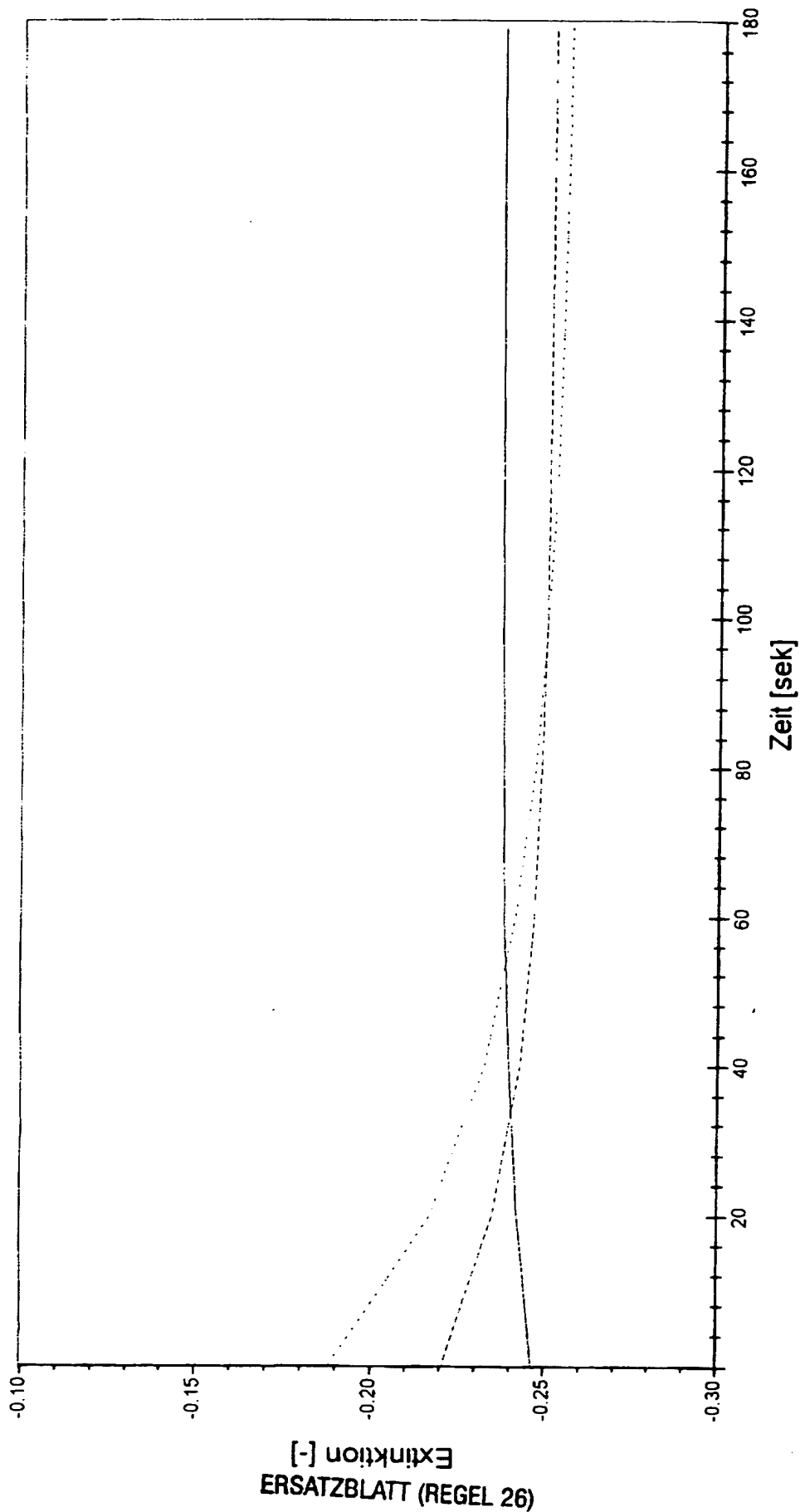


Abb. 7

— kein Hb      --- 1000mg/dl Hb      ... 2000mg/dl Hb

# Albumin BCG (Citrat-Puffer), 2-Reagenz-Test/Einfluß von Hämoglobin (DCI-Hb)

Wellenlänge 505/570 nm (Neben/Haupt)

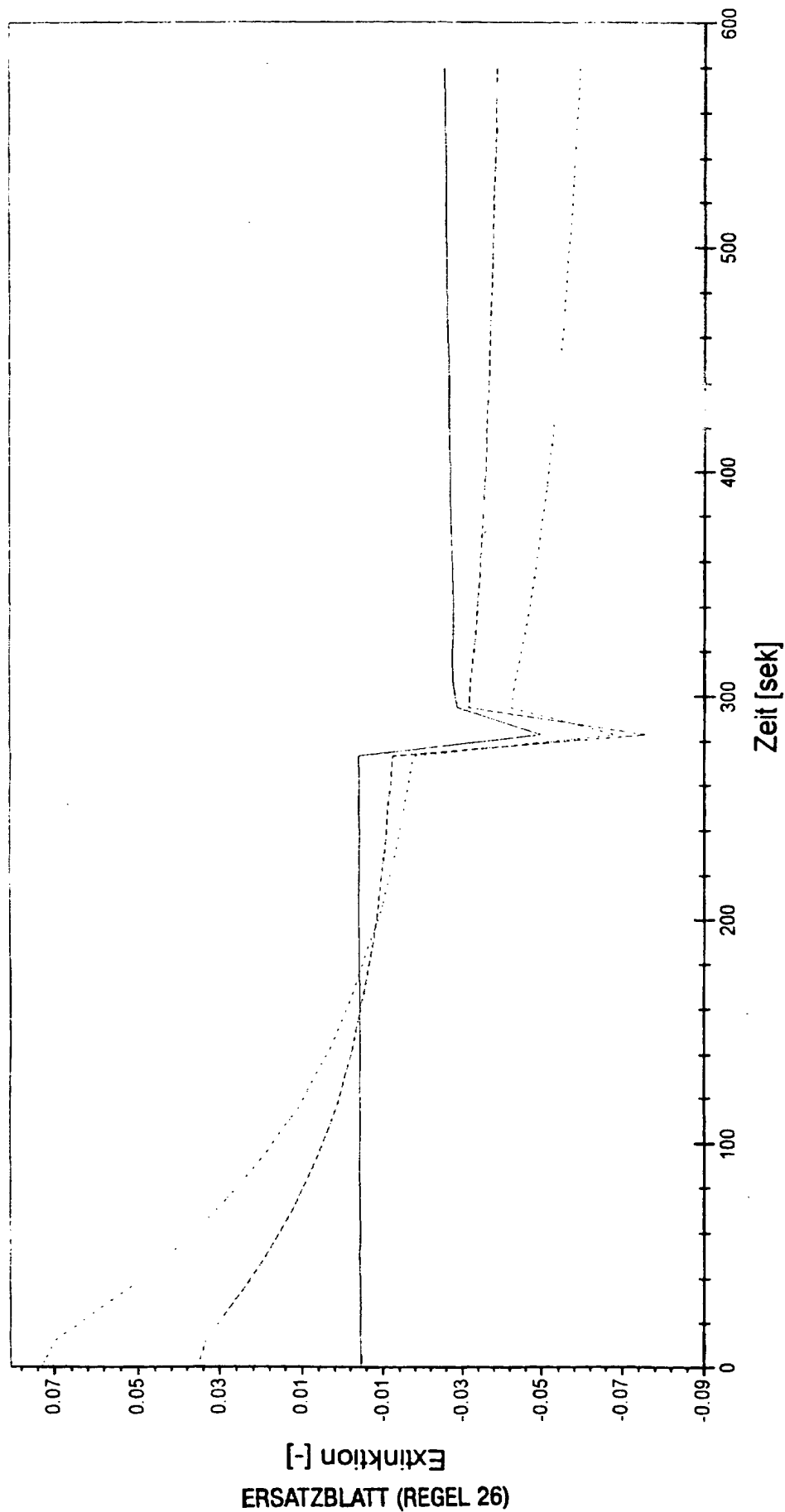


Abb. 8

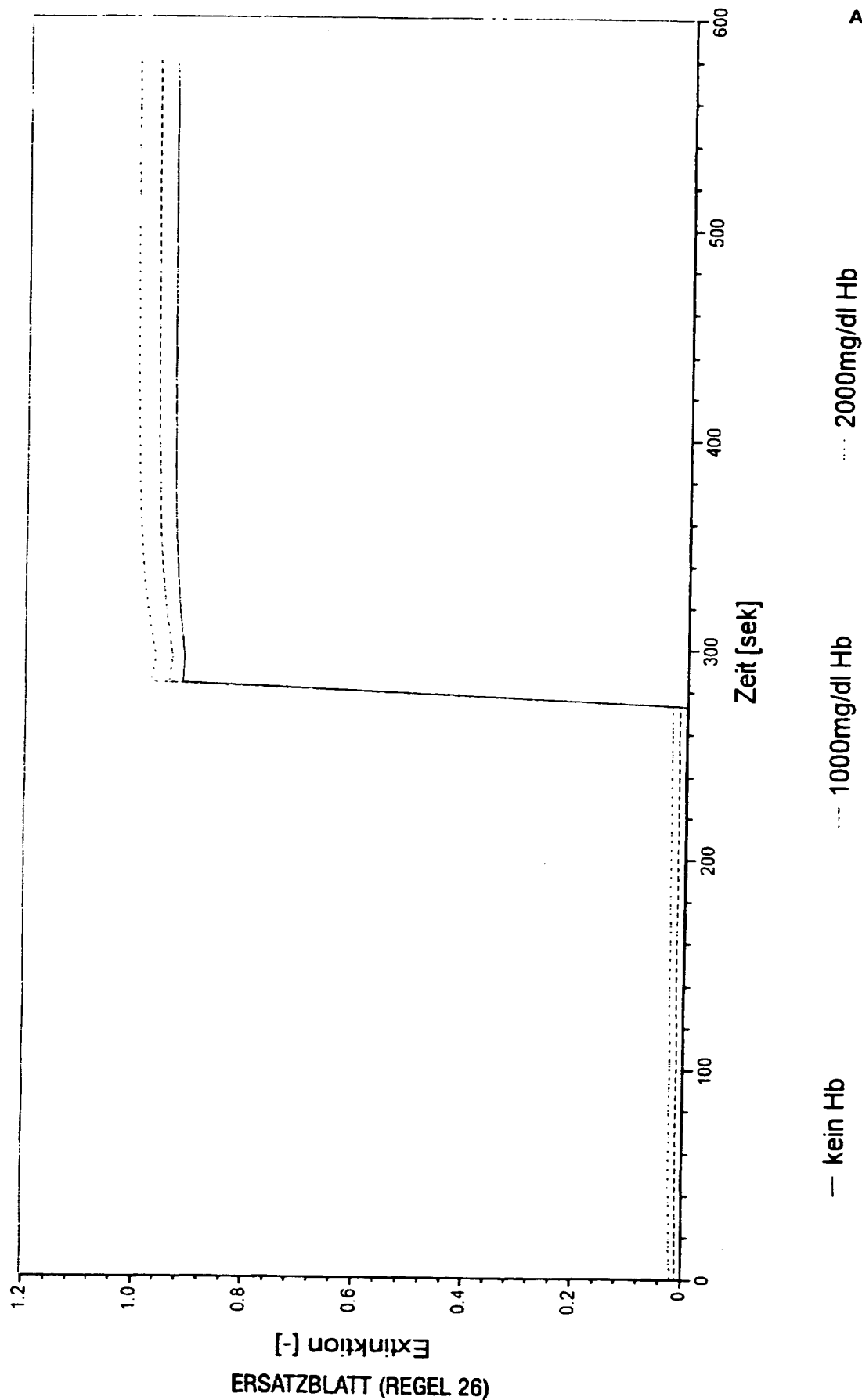


9/13

Abb. 9

# Albumin BCP , 2-Reagenzien-Test / Einfluß von Hämoglobin (DCI-Hb)

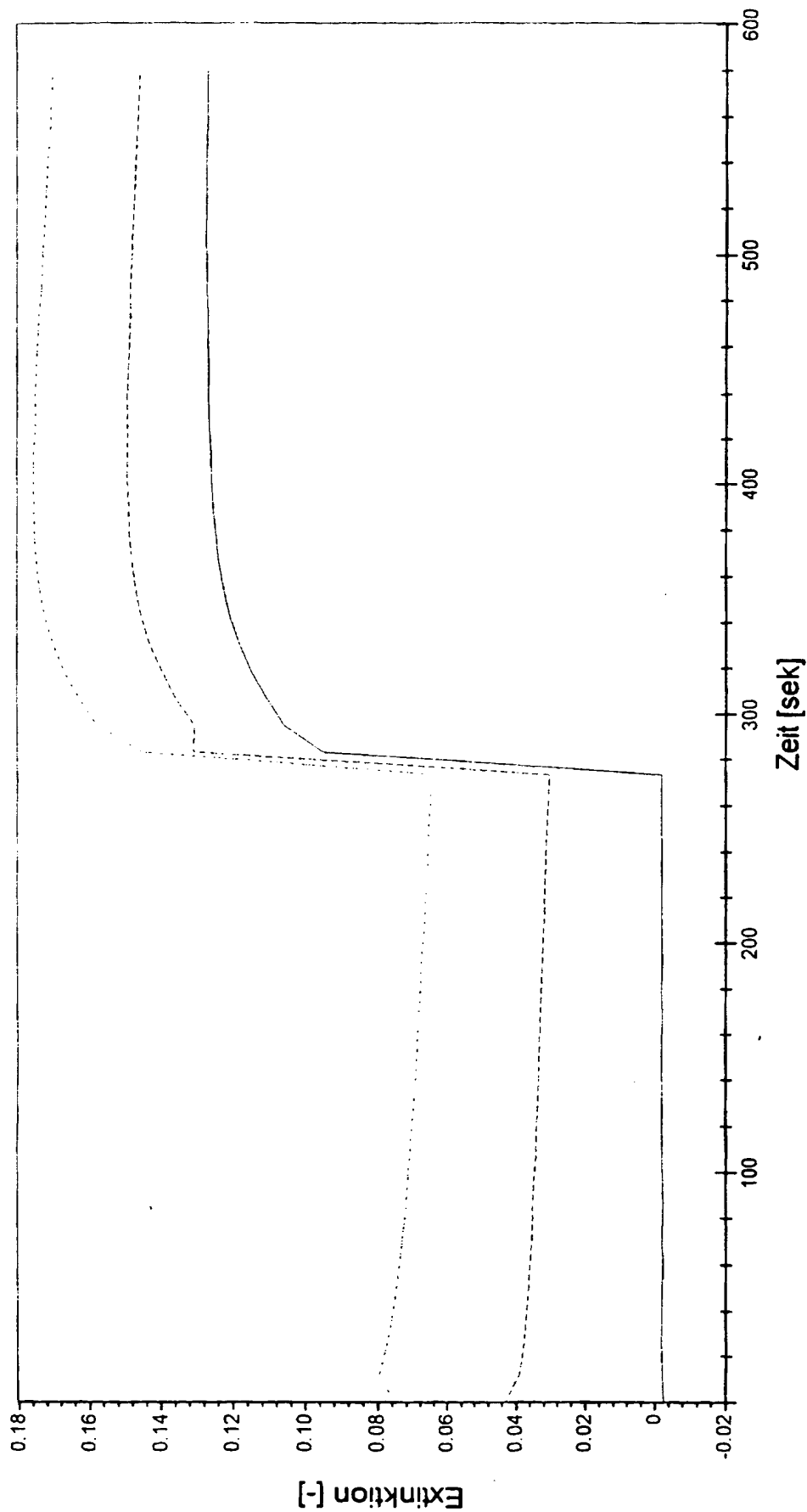
Wellenlänge 700/600 nm (Neben/Haupt)



ERSATZBLATT (REGEL 26)

# Albumin BCP , 2-Reagenzien-Test / Einfluß von Hämoglobin (DCI-Hb)

Wellenlänge 505/570 nm (Neben/Haupt)



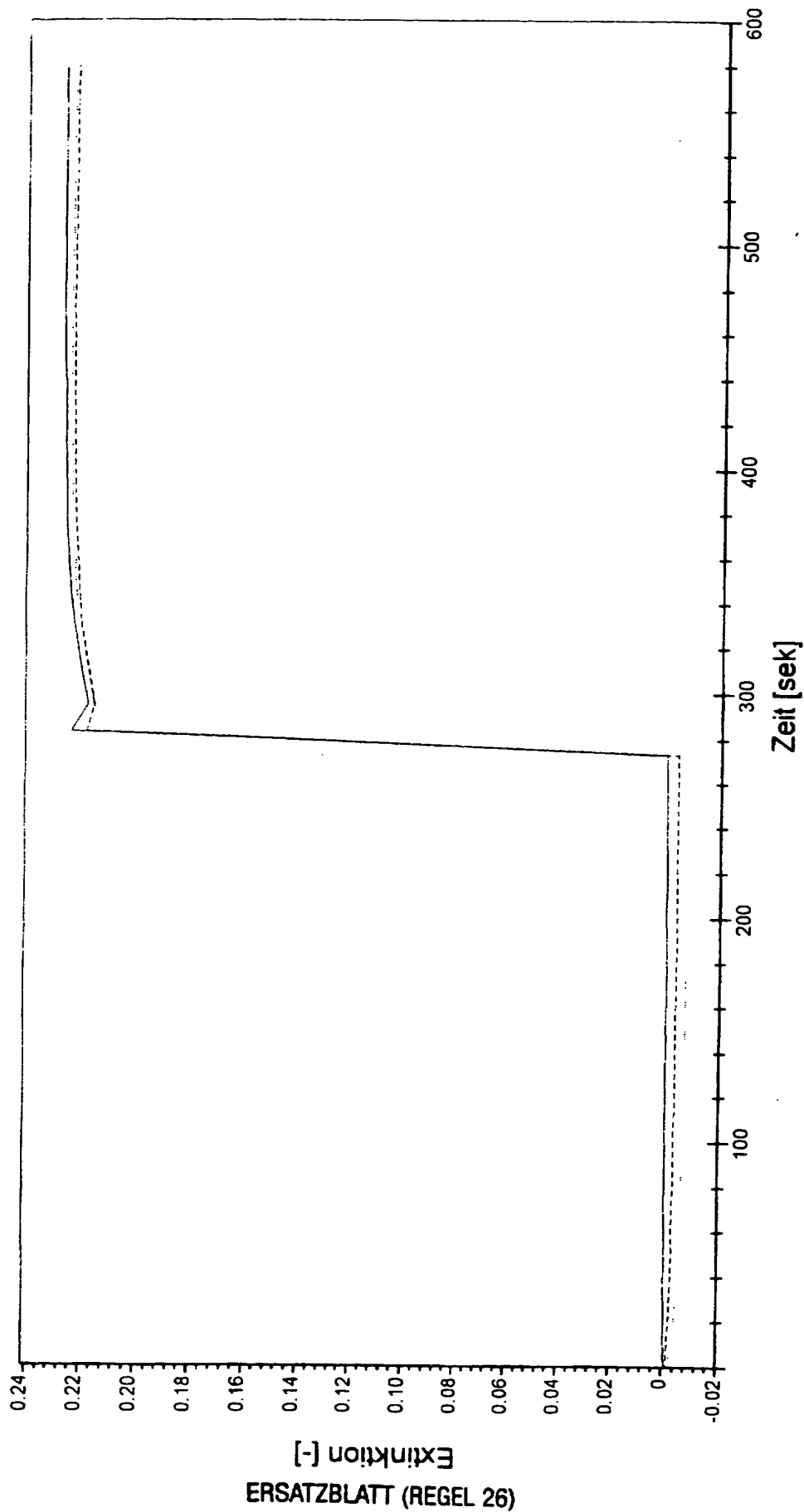
— kein Hb      --- 1000mg/dl Hb      .... 2000mg/dl Hb

Abb. 10

ERSATZBLATT (REGEL 26)

# Albumin BCP , 2-Reagenzien-Test / Einfluß von Hämoglobin (DCI-Hb)

Wellenlänge 546/570 nm (Neben/Haupt)



2000mg/dl Hb

--- 1000mg/dl Hb

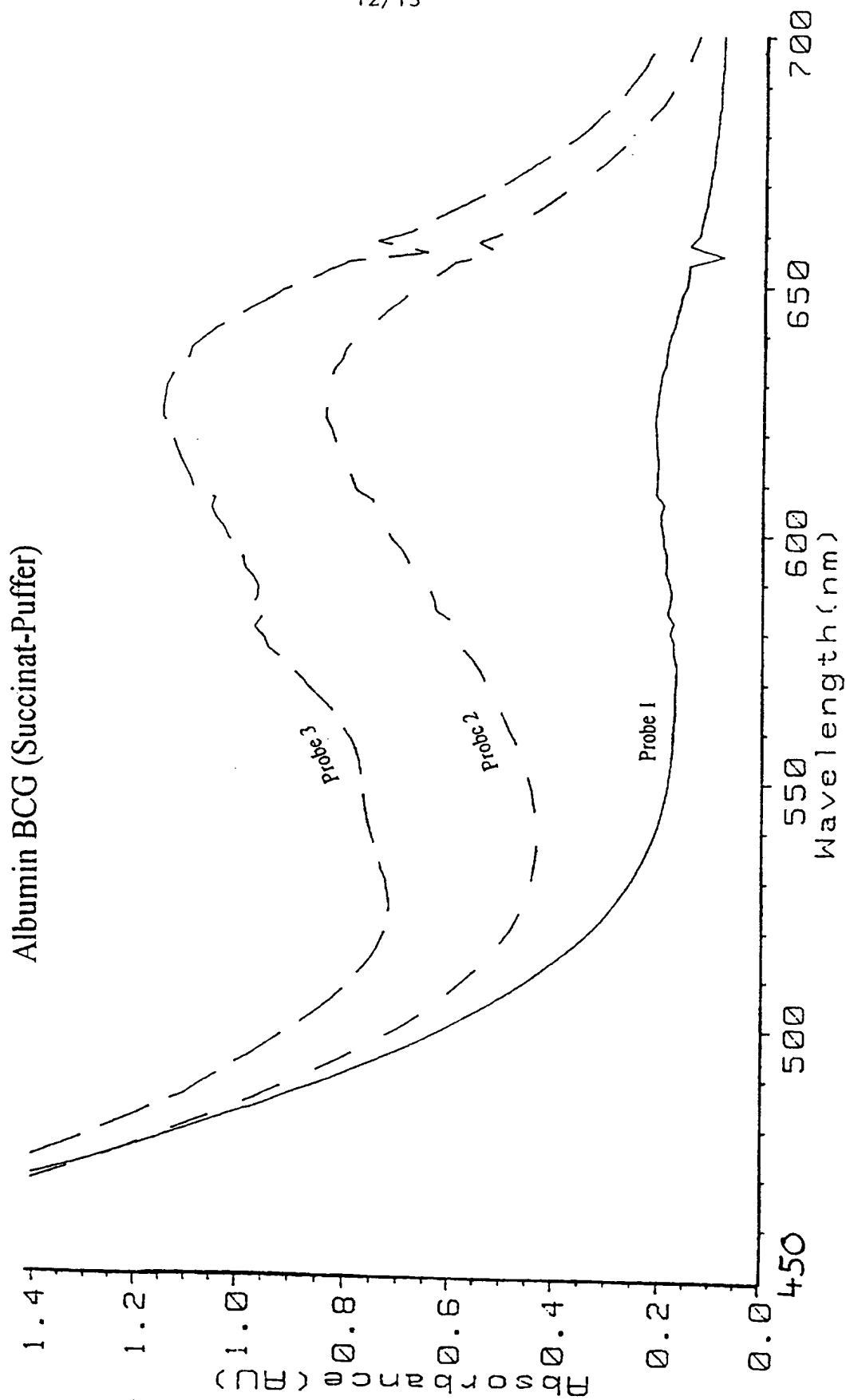
— kein Hb

Abb. 11

ERSATZBLATT (REGEL 26)

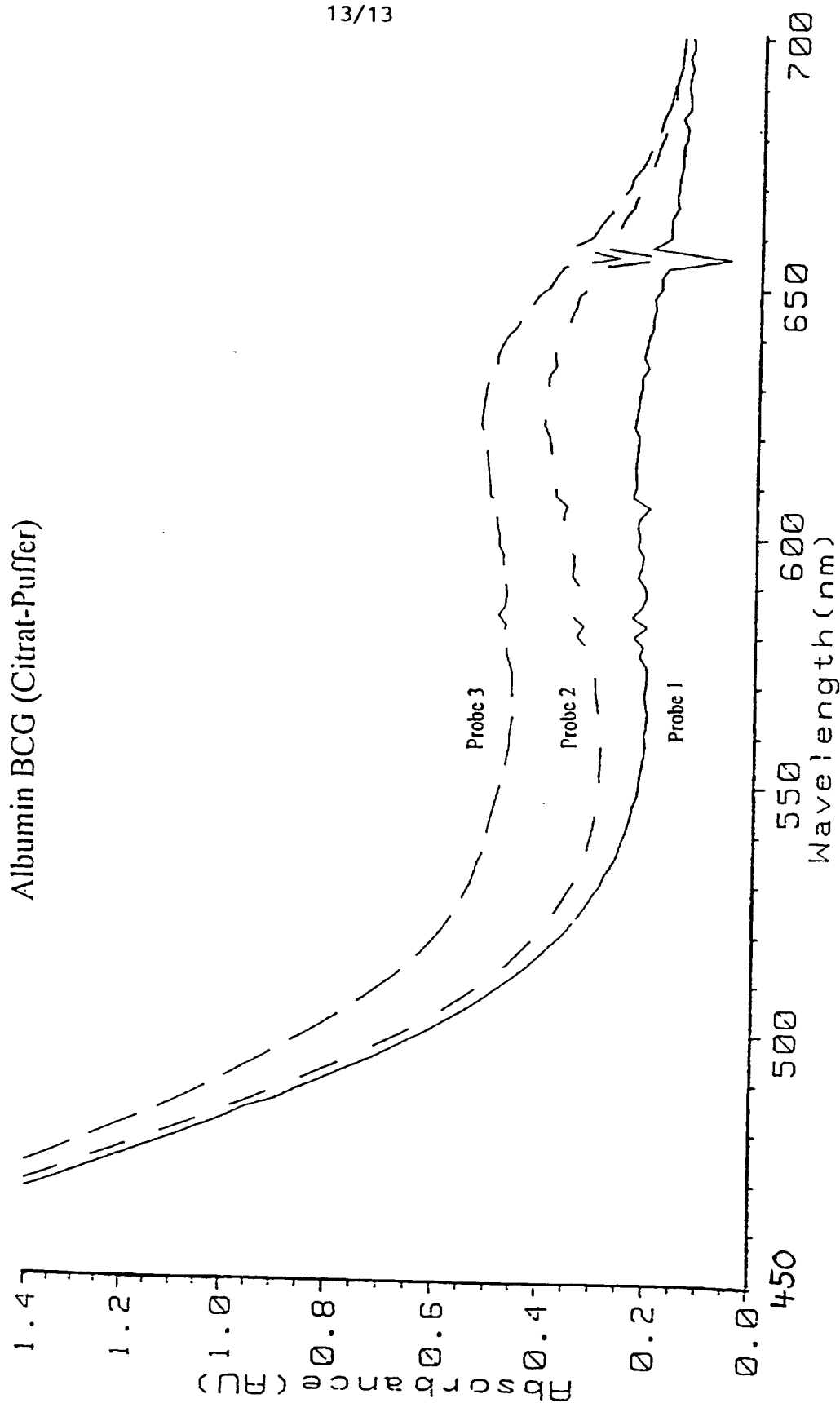
12/13

Abb. 12



Probe 1: NaCl (0.9%)  
 Probe 2: Serum + NaCl  
 Probe 3: Serum + DCI-Hb  
 Reaktionszeit: 90 sek.

ERSATZBLATT (REGEL 26)



Probe 1: NaCl (0.9%)  
Probe 2: Serum + NaCl  
Probe 3: Serum + DCl-Ib  
Reaktionszeit: 90 sek.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. l. Application No  
 PCT/EP 97/02862

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 6 G01N33/487 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 695 805 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 7 February 1996 cited in the application see the whole document ---	1-29
A	EP 0 268 025 A (HITACHI LTD) 25 May 1988 cited in the application see the whole document ---	1-29
A	US 5 284 777 A (ROSENTHAL MURRAY A ET AL) 8 February 1994 see the whole document --- -/-	1-29

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 September 1997

Date of mailing of the international search report

30-09-1997

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoekstra, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/EP 97/02862

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN  vol. 012, no. 441 (P-789), 21 November  1988  &amp; JP 63 169564 A (SHIMADZU CORP), 13 July  1988,  see abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-29

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/02862

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0695805 A	07-02-96	DE 4427492 A JP 8101191 A	08-02-96 16-04-96
EP 0268025 A	25-05-88	JP 63050743 A	03-03-88
US 5284777 A	08-02-94	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/02862

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 G01N33/487 G01N33/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 695 805 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 7. Februar 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-29
A	EP 0 268 025 A (HITACHI LTD) 25. Mai 1988 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-29
A	US 5 284 777 A (ROSENTHAL MURRAY A ET AL) 8. Februar 1994 siehe das ganze Dokument ---	1-29
-/-		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. September 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

30-09-1997

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hoekstra, S

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 97/02862

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 012, no. 441 (P-789), 21.November 1988 &amp; JP 63 169564 A (SHIMADZU CORP), 13.Juli 1988, siehe Zusammenfassung -----</p>	1-29

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/02862

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0695805 A	07-02-96	DE 4427492 A JP 8101191 A	08-02-96 16-04-96
EP 0268025 A	25-05-88	JP 63050743 A	03-03-88
US 5284777 A	08-02-94	KEINE	

